8月 August
2020, 63(8): 913 – 923
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2020.08.001

小分子热激蛋白基因 *HaHSP19.8* 在棉铃虫抗逆反应中的作用

魏纪珍[1], 王 凯[1], 刘少凯[1], 刘晓光[1], 梁革梅[2], 杜孟芳[1,*], 安世恒[1]

(1. 河南农业大学植物保护学院, 省部共建小麦玉米作物学国家重点实验室, 郑州 450002;
2. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要:【目的】小分子热激蛋白(small heat shock protein, sHSP)在昆虫抵御外界环境压力中至关重要。本研究旨在探究小分子热激蛋白 sHSP19.8 基因在棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 生长发育、抵御高温胁迫和对 Cry1Ac 杀虫蛋白抗性机制中的作用,为更深入探析该基因作用机理及棉铃虫的防治奠定基础。【方法】通过 PCR 结合 RACE 克隆棉铃虫 *sHSP19.8* 基因序列,利用生物信息学软件对该基因序列进行分析;通过 qRT-PCR 测定 Cry1Ac 敏感棉铃虫 5 龄幼虫在 40℃ 高温下处理 1 h 和 2 h及饲喂含30 μg/mL Cry1Ac 的人工饲料 1 h 和 2 h 后该基因的表达量,并测定抗感 Cry1Ac 棉铃虫不同发育阶段(1 – 5 龄幼虫、蛹及成虫)和 5 龄幼虫不同组织(前肠、中肠、后肠、马氏管及表皮)中该基因的表达模式。【结果】获得了棉铃虫 *sHSP19.8* 基因的全长 cDNA 序列,命名为 *HaHSP19.8* (GenBank 登录号: XP_021195228.1),长 608 bp,开放阅读框长 528 bp,编码 175 个氨基酸残基,具有小分子热激蛋白的典型 α-晶体结构域(α-crystallin domain, ACD)。该基因受 40℃ 高温和 30 μg/mL Cry1Ac 杀虫蛋白诱导时在 Cry1Ac 敏感棉铃虫 5 龄幼虫中均过量表达;在 Cry1Ac 敏感棉铃虫整个发育阶段和 5 龄幼虫各组织中均表达,其中在成虫和 5 龄幼虫以及 5 龄幼虫表皮、马氏管和中肠内表达量较高;但是该基因在 Cry1Ac 抗性品系各个发育阶段和 5 龄幼虫各组织中表达量相比敏感品系都显著较低。【结论】结果说明 *HaHSP19.8* 参与棉铃虫生长发育和生理生化的过程,帮助昆虫抵御外界环境压力,并可能参与到棉铃虫对 Cry1Ac 的抗性机制中。

关键词: 棉铃虫; 小分子热激蛋白; *sHSP19.8*; Cry1Ac; 表达分析

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2020)08-0913-11

Role of the small heat shock protein gene *HaHSP19.8* in response to stress in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)

WEI Ji-Zhen[1], WANG Kai[1], LIU Shao-Kai[1], LIU Xiao-Guang[1], LIANG Ge-Mei[2], DU Meng-Fang[1,*], AN Shi-Heng[1] (1. State Key Laboratory of Wheat and Maize Crop Science, College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. State Key Laboratory of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract:【Aim】Small heat shock proteins (sHSPs) play important roles in resisting external environmental pressure in insects. This study aims to explore the functions of a small heat shock protein gene, *sHSP19.8*, in the growth and development of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, and its

基金项目: 国家自然科学基金项目(31802016); 2019 年度河南省青年人才托举工程项目(2019HYTP014); 河南农业大学自然科学类青年创新基金(KJCX2018A14); 河南农业大学青年英才启动基金; 河南省现代农业产业技术体系(S2014-11-G06)

作者简介: 魏纪珍, 女, 1986 年 3 月生, 河南驻马店人, 博士, 讲师, 研究方向为昆虫毒理学、昆虫生理与分子生物学, E-mail: weijizhen1986@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: dumengfang@163.com

收稿日期 Received: 2020-01-06; 接受日期 Accepted: 2020-02-15

role in response to high temperature stress and insecticidal protein, so as to provide a foundation for further exploring its action mechanisms and controlling the cotton bollworm. 【Methods】The full-length cDNA sequence of *sHSP19.8* gene was cloned from *H. armigera* by RCR and RACE, and analyzed by bioinformatics software. The expression levels of *sHSP19.8* gene in the 5th instar larvae of the Cry1Ac-susceptible cotton bollworm exposed to 40℃ for 1 h and 2 h and fed with the artificial diet containing 30 μg/mL Cry1Ac for 1 h and 2 h, respectively, were detected by qRT-PCR. Meanwhile, the expression patterns of *sHSP19.8* gene in different developmental stages (1st – 5th instar larva, pupa and adult) and tissues (foregut, midgut, hindgut, Malpighian tubules and cuticle) of the 5th instar larvae of the Cry1Ac-susceptible and resistant cotton bollworm were also assayed by qRT-PCR. 【Results】The full-length cDNA sequence of *sHSP19.8* from *H. armigera* was obtained and named *HaHSP19.8* (GenBank accession no.: XP_021195228.1). It is 608 bp in length with an open reading frame (ORF) of 528 bp, encoding 175 amino acids. The encoded protein has the typical α-crystallin domain (ACD). After induction by high temperature of 40℃ and 30 μg/mL Cry1Ac, *HaHSP19.8* showed over-expression in the 5th instar larvae of the Cry1Ac-susceptible cotton bollworm. *HaHSP19.8* was ubiquitously expressed in all the examined developmental stages and tissues of the 5th instar larvae of the Cry1Ac-susceptible cotton bollworm, with relatively higher expression levels in adults and the 5th instar larvae, and the cuticle, Malpighian tubules and midgut of the 5th instar larvae. However, *HaHSP19.8* showed lower expression levels in all the examined developmental stages and tissues of the 5th instar larvae of the Cry1Ac-resistant cotton bollworm than in those of the Cry1Ac-susceptible cotton bollworm. 【Conclusion】The results suggest that *HaHSP19.8* may participate in the growth and development of the cotton bollworm to resist the environment stress, and may be involved in the resistance to Cry1Ac.

Key words: *Helicoverpa armigera*; small heat shock protein; *sHSP19.8*; Cry1Ac; expression analysis

热激蛋白(heat shock protein, HSP)因响应热刺激而得名,但它的快速合成也响应其他多种环境因子的压力,其中包括温度、重金属、滞育和杀虫剂等(Huang and Kang, 2007; Yang *et al.*, 2016)。热激蛋白常作为分子伴侣参与调控多种分子功能,例如蛋白质的折叠、组装、分泌和降解等,来维持压力和非压力下的体内平衡(Hartl and Hayer-Hartl, 2002; Nollen and Morimoto, 2002)。根据氨基酸的同源性和分子量大小,热激蛋白可以分为5类: HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 和 sHSPs (Feder and Hofmann, 1999)。小分子热激蛋白是普遍存在的独立于三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)的分子伴侣,在几乎所有的生物中,它们可以阻止蛋白质在压力应激下的聚集(Bepperling *et al.*, 2012)。小分子热激蛋白分子量12~42 kD不等,各小分子热激蛋白的同源性较低,与其他的热激蛋白相比,其唯一的特征是保留了保守的α-晶体结构域(α-crystallin domain, ACD)(Kriehuber *et al.*, 2010; Basha *et al.*, 2012)。另外,被命名为生命必需的致死蛋白[protein lethal(2) essential for life-like, l(2)efl]也属于小分子的热激蛋白家族(Kurzik-Dumke and Lohmann, 1995)。

科学家们在对杀虫剂的胁迫或抗性的研究中发现,昆虫体内热激蛋白广泛地响应杀虫剂的诱导,甚至参与到昆虫对杀虫剂的抗性中。吡虫啉处理后,褐飞虱 *Nilaparvata lugens* *HSP70* 基因的表达显著上调,干扰该基因会使褐飞虱抵御杀虫剂的抗性增强(Lu *et al.*, 2017)。黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 取食杀虫剂后,*HSP26* 和 *HSP60* 基因会显著上调(Doganlar and Doganlar, 2015)。苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* (Bt)是目前广泛应用的生物源杀虫剂,靶标昆虫的热激蛋白在抵御Bt的压力中作用也被逐步被研究。其中在棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 和棉铃象 *Anthonomus grandis* 中,HSP被报道能与Bt蛋白结合(Chen *et al.*, 2010; Nakasu *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2013)。蛋白质组学研究表明,Cry1Ac处理后,棉铃虫幼虫 *HSP70* 基因的表达量降低(Yuan *et al.*, 2011)。取食Cry11Aa后,埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 的 *HSP90* 基因的表达量降低,干扰 *HSP90* 会使埃及伊蚊对Cry11Aa的抗性增强(Cancino-Rodezno *et al.*, 2012)。云杉夜蛾 *Choristoneura fumiferana* 取食亚致

死剂量的 Cry1Ab 后，*HSP90* 基因的表达量显著上调（Meunier *et al.*, 2006）。小菜蛾 *Plutella xylostella* HSP70 被报道可能是 Cry1Ac 的结合蛋白，*HSP70* 基因表达量的下调参与了小菜蛾对 Cry1Ac 的抗性（Xia *et al.*, 2016）。

棉铃虫属鳞翅目（Lepidoptera）夜蛾科（Noctuidae）实夜蛾属 *Helicoverpa*，是一种世界性分布的重要农业害虫，危害棉花、玉米、蔬菜等 300 多种作物（Wu and Guo, 2005; Wu, 2007）。近些年来，对转 *Cry1Ac* 棉花的普遍推广，虽然有效地防治了棉铃虫的危害，但田间棉铃虫对转基因棉花的抗性水平也在显著地增加（Zhang *et al.*, 2012; An *et al.*, 2014; Jin *et al.*, 2015）。且随着我国棉花种植结构的调整，Bt 棉花主要集中在新疆地区大面积种植（陆宴辉等, 2018），缺少合理的庇护所，可能会引起棉铃虫对 Bt 棉花抗性的快速发展。为达到长期有效的防治效果，需要对棉铃虫抵御 Bt 的机理和 Bt 的作用机制进行深入的研究。我们前期通过对抗感 Cry1Ac 棉铃虫的转录组数据分析发现，一些小分子的热激蛋白表现出显著差异（Wei *et al.*, 2018）。本研究中，我们鉴定得到了棉铃虫的一个小分子热激蛋白 sHSP19.8，其可能参与到棉铃虫对 Cry1Ac 抗性机制；通过 RACE 和 PCR 克隆了该小分子热激蛋白 sHSP19.8 的基因序列，通过 qRT-PCR 技术分析了棉铃虫受温度和 Cry1Ac 处理后该基因的表达情况，同时分析了该基因在抗、感 Cry1Ac 棉铃虫各发育阶段和 5 龄幼虫各组织中的表达谱，为明确 HSP19.8 在棉铃虫生长发育、抵抗外界压力和对 Cry1Ac 抗性机制中的作用奠定理论基础。

1　材料与方法

1.1　供试棉铃虫

本研究采用的 Cry1Ac 敏感棉铃虫为 LF 品系，该品系棉铃虫于 2005 年采集于河北省廊坊市棉田，幼虫饲喂棉铃虫人工饲料，成虫饲喂 10% 的糖水，一直在室内人工饲养，未接触任何杀虫剂（梁革梅等, 1999）。室内饲养环境温度为 27 ± 2℃，相对湿度 75% ± 10%，光周期为 14L∶10D。本研究中采用的 Cry1Ac 抗性棉铃虫 LF120 品系来源于 LF 品系，经 MVPII [Dow AgroSciences，一种含有 Cry1Ac 原毒素的商品化杀虫剂（Welch *et al.*, 2015）] 梯度筛选（5, 10, 20, 30, 60 和 120 μg/mL Cry1Ac 前毒素每毫升饲料）后，分离出 LF120 的抗 Cry1Ac 品系（Cao *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2015），其对 Cry1Ac 的抗性水平有 1 600 倍（Wei *et al.*, 2016）。

1.2　总 RNA 的提取和 cDNA 合成

饲养 LF 敏感品系的棉铃虫，取生长状况一致的 5 龄棉铃虫幼虫，放入 40℃ 培养箱，高温处理 1 h 和 2 h 后，立即放入液氮冷冻，再转到 －80℃ 冰箱中保存备用。每种处理取样 3 头，设置 4 次生物学重复。27℃ 正常饲养的 5 龄棉铃虫作为对照。

饲养 LF 敏感品系的棉铃虫，取生长状况一致的 5 龄棉铃虫幼虫，饥饿 24 h 后，转到含 30 μg/mL Cry1Ac 全长杀虫蛋白（该浓度是敏感棉铃虫 5 龄幼虫 7 d 30% 的死亡剂量）或正常（不含 Cry1Ac）的人工饲料上，饲喂 1 h 和 2 h 后，立即在冰上解剖取中肠，如上用 4℃ 预冷的 0.7% NaCl 溶液洗去内含物，用滤纸吸干水分，迅速放入液氮冷冻后再转存到 －80℃ 冰箱保存备用。各处理下取样 10 头为一个生物学重复，设置 4 次生物学重复。

分别饲养 LF 和 LF120 品系的棉铃虫，收集 1 龄幼虫（20 头）、2 龄幼虫（10 头）、3 龄幼虫（5 头）、4 龄幼虫（3 头）、5 龄幼虫（3 头）、蛹（3 头）和成虫（3 头）期的棉铃虫，上述取样数量为一个生物学重复，该样品用于比较不同品系不同发育期，基因的表达模式。分别准备 LF 和 LF120 品系的棉铃虫 5 龄幼虫（各 10 头），冰上解剖棉铃虫的前肠、中肠、后肠、马氏管和表皮。前肠、中肠和后肠用 4℃ 预冷的 0.7% NaCl 溶液洗去内含物，用滤纸吸干水分后迅速放入液氮冷冻，后转到 －80℃ 冰箱保存备用，用于比较不同品系不同组织中基因的差异。各样品的准备均设置 3 次生物学重复。

以上各处理样品总 RNA 的提取按照 Invitrogen 的操作说明利用 Trizol 法提取。RACE 扩增目的基因所用的 cDNA 模板的合成，取敏感棉铃虫 5 龄幼虫的中肠组织，参考 SMATR-erRRACE cDNA Amplification Kit 说明书操作。qRT-PCR 所用 cDNA 模板依照 SuperReal PreMix（Probe）说明书合成。

1.3　棉铃虫 *sHSP19.8* 基因全长 cDNA 克隆

根据棉铃虫的转录组数据（Wei *et al.*, 2018），分析得到 *sHSP19.8* 的部分序列，利用 Primer 5.0 分子生物学软件设计 5′RACE 特异性引物 sHSP19.8-RACE-5′（表 1），以 1.2 节合成的敏感棉铃虫 5 龄幼虫的中肠 RACE cDNA 为模板，扩增 *sHSP19.8* 基因的 5′端序列。PCR 反应体系（25 μL）：cDNA 1 μL，引物 sHSP19.8-RACE-5′（10 mmol/L）0.5 μL，UPM 2.5 μL，10 × Buffer 2.5 μL，LATaq 0.25 μL，

无菌水 17.25 μL。PCR 反应程序：94℃ 预变性 4 min；94℃变性 30 s，72℃ 延伸 3 min，循环 5 次；94℃变性 30 s，70℃退火 30 s，72℃延伸 3 min，循环 5 次；94℃变性 30 s，68℃退火 30 s，72℃延伸 3 min，循环 35 次；72℃保温 10 min。PCR 产物通过 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳（DYY-6C 琼脂糖水平电泳仪，北京六一仪器厂）进行检测，确定目的条带后，送北京博迈德基因技术有限公司进行序列测定。根据测定序列与已知序列拼接，再设计特异性引物 sHSP19.8-ORF-F 和 sHSP19.8-ORF-R（表 1），以 1.2 节合成的敏感品系棉铃虫 5 龄幼虫中肠 cDNA 为模板，扩增其开放阅读框。PCR 反应体系（25 μL）：cDNA 1 μL，sHSP19.8-ORF-F/sHSP19.8-ORF-R（10 mmol/L）各 0.5 μL，dNTPs 1 μL，10 × EasyTaq Buffer 2.5 μL，EasyTaq E 0.25 μL，无菌水 19.25 μL。PCR 反应程序：94℃ 预变性 4 min；94℃ 变性 30 s，58℃退火 30 s，72℃延伸 1 min，循环 35 次；72℃保温 10 min。再次电泳和测序验证。

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

引物 Primer	引物序列（5′-3′） Primer sequence	引物用途 Use of primers
sHSP19.8-RACE-5′	GGAACACAACCTTCAGGCAACGCATAAC	5′RACE
sHSP19.8-ORF-F	TGCGATCCTACGATTCTAC	开放阅读框的扩增 ORF amplification
sHSP19.8-ORF-R	AATGACTAAAATTAAACGAGATC	
sHSP19.8-RTPCR-F	CGCTGGTGAACAGAGAGTACTACAG	qRT-PCR 中目的基因扩增 Amplification of target gene in qRT-PCR
sHSP19.8-RTPCR-R	ATGGAGGATCCGACGTCTCTT	
sHSP19.8-RTPCR-P	CTGGCGCCACCTCGCTGCA	
Actin-RTPCR-F	GGTGCACTGGCGATATTGG	qRT-PCR 中内参基因扩增 Amplification of the reference genes in qRT-PCR
Actin -RTPCR-R	CTTGGGTCTTGACAGCAATGC	
Actin -RTPCR-P	AACCCCTTGGTCTGCCATGATAGCCTT	
GAPDF-RTPCR-F	CATTGAAGGTCTGATGACCACTGT	
GAPDF -RTPCR-R	CAGAGGGTCCATCCACTGTCTT	
GAPDF -RTPCR-P	CACGCCACCATTGCCACCCA	

1.4 基因序列分析和系统发育树构建

用基因探索者软件对 *sHSP19.8* 基因的可阅读框长度进行预测，并翻译成对应的氨基酸序列；利用 SWISS-MODEL 在线软件分析蛋白质的相对分子量、等电点和结构域；在 NCBI 数据库中进行 BLASTp 同源序列分析，选取不同昆虫的 *sHSP* 基因，利用 MEGA 7（7.0.14）软件，选择 Jones-Taylor-Thornton（JTT）模型，利用最大相似法（maximum likelihood method）构建系统进化树进行聚类分析。

1.5 基因表达量 qRT-PCR 分析

根据棉铃虫 *sHSP19.8* 的 cDNA 序列，由 Inviotrogen 公司设计合成 Taqman 探针 sHSP19.8-RTPCR-P（5′端用 FAM 标记，3′端用 MGB 标记）及 qRT-PCR 的特异性引物 sHSP19.8-RTPCR-F 和 sHSP19.8-RTPCR-R（序列见表 1）。qRT-PCR 分析采用双内参法，内参基因分别为棉铃虫 *GAPDH*（GenBank 登录号：JF417983.1）和 *Actin*（GenBank 登录号：X97615.1），内参基因的引物和探针同样由 Inviotrogen 公司设计合成（序列见表 1）。RT-PCR 反应体系（20 μL）：MaximaR Probe/ROX qPCR Master Mix（2×）10 μL，正反向引物（10 μmol/L）各 0.6 μL，探针（10 μmol/L）0.4 μL，cDNA 2 μL 和无菌水 6.4 μL。PCR 反应体系于 96 孔板中，采用 7500 Fast 实时荧光定量 PCR 仪（美国 ABI 公司）进行反应。RT-PCR 反应程序：95℃预变性 10 min；然后 95℃ 变性 3 s，60℃退火/延伸 30 s，循环 40 次。每个生物学处理进行 3 次技术重复。数据分析使用相对定量分析方法，计算公式采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法（Livak and Schmittgen, 2001）。$\Delta Ct = Ct_{目标基因} - Ct_{内参基因}$，$Ct_{内参基因} = (Ct_{Actin} + Ct_{GAPDH})/2$，$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{处理样品} - \Delta Ct_{参照样品}$。

1.6 数据分析

采用 DPS7.05 软件对实验数据进行方差分析，其中同一品系不同发育阶段、不同组织、温度或药剂不同处理时间之间的方差分析采用单因素 Turkey 氏法进行显著性分析；LF 和 LF120 两个品系间的各龄期和各组织间采用独立样本 *t* 检验进行差异显著性分析。

2　结果

2.1　棉铃虫 *sHSP19.8* 基因序列及系统进化位置

通过 RACE 和 PCR 技术，从棉铃虫中扩增了一条 608 bp 的 *sHSP* 基因序列，经基因软件分析该序列包含开放阅读框长 528 bp 的基因序列，该序列编码 175 个氨基酸，GenBank 登录号为 XP_021195228.1。通过 SWISS-MODEL 在线软件预测其蛋白分子量为 19.8 kD，等电点为 6.22，我们将其命名为 *HaHSP19.8*。对 *HaHSP19.8* 基因结构域进行预测分析，结果表明 *HaHSP19.8* 具有可变的 N 末端区域（第 1 – 48 位氨基酸残基），小分子热激蛋白保守的 α-晶状体结合域（氨基酸残基第 49 – 160 位），以及 C 末端区域（第 161 – 175 位氨基酸残基）（图 1）。

将 HaHSP19.8 的氨基酸序列与其他 13 种昆虫的 sHSP 氨基酸序列比较，发现不同物种间的差异主要在 N 端，这与小分子热激蛋白具有可变的 N 末端区域（第 1 – 48 位氨基酸残基）这一特性相吻合（图 2）。同时它们具有类似的中间 α-晶状体结合域和延伸的 C 端（图 2）。通过比对分析，HaHSP19.8 的氨基酸序列与黏虫 *Mythimna separata* 的 sHSP19.7、甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* 的 sHSP19.7 和斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 的 l(2)efl 氨基酸序列一致性在 90% 以上；与其他作比较的鳞翅目夜蛾科昆虫的 sHSP 氨基酸序列一致性在 80% 以上（图 2）。

为了进一步研究 *HaHSP19.8* 基因的进化关系，我们将 HaHSP19.8 的氨基酸序列与其他 14 种昆虫的 sHSP 蛋白进行了进化树分析（图 3）。结果表明，HaHSP19.8 与鳞翅目其他昆虫的 sHSP 聚在了同一进化支上，其中与已经鉴定的黏虫的 sHSP19.7 的进化关系最近，其次是与甘蓝夜蛾和斜纹夜蛾（图 3），这与上述基于氨基酸序列的分析结果一致。

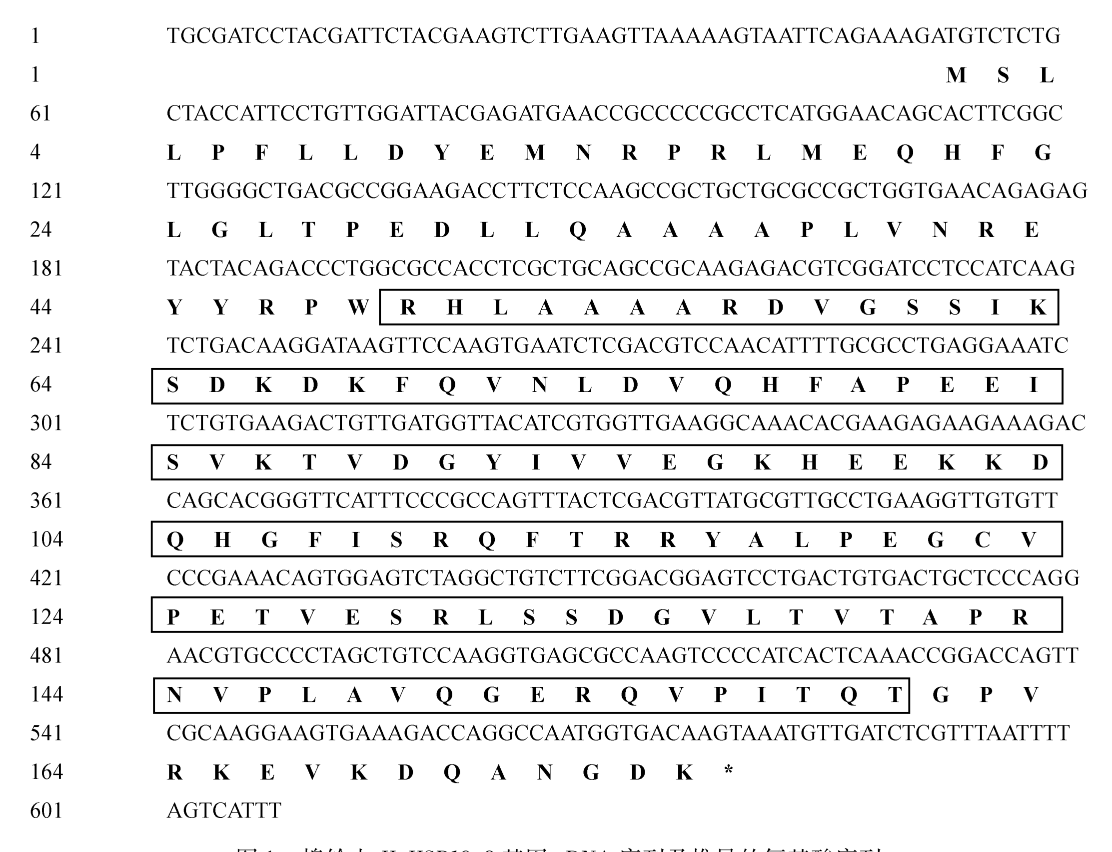


图 1　棉铃虫 *HaHSP19.8* 基因 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1　Nucleotide and deduced amino acid sequences of *HaHSP19.8* gene from *Helicoverpa armigera*

方框中为 α-晶状体结构域。星号表示氨基酸翻译终止。The α-crystalline domain is shown in the box. The asterisk indicates termination of amino acid translation.

2.2　*HaHSP19.8* 在 Cry1Ac 敏感棉铃虫中受高温和 Cry1Ac 诱导时的表达差异

HaHSP19.8 基因是典型的热激蛋白基因，该基因的表达响应温度的调控，40℃ 高温处理后，棉铃虫敏感品系 5 龄幼虫中均表现出该基因的显著上调表达（图 4：A），特别是在处理后 1 h 时，基因显著上

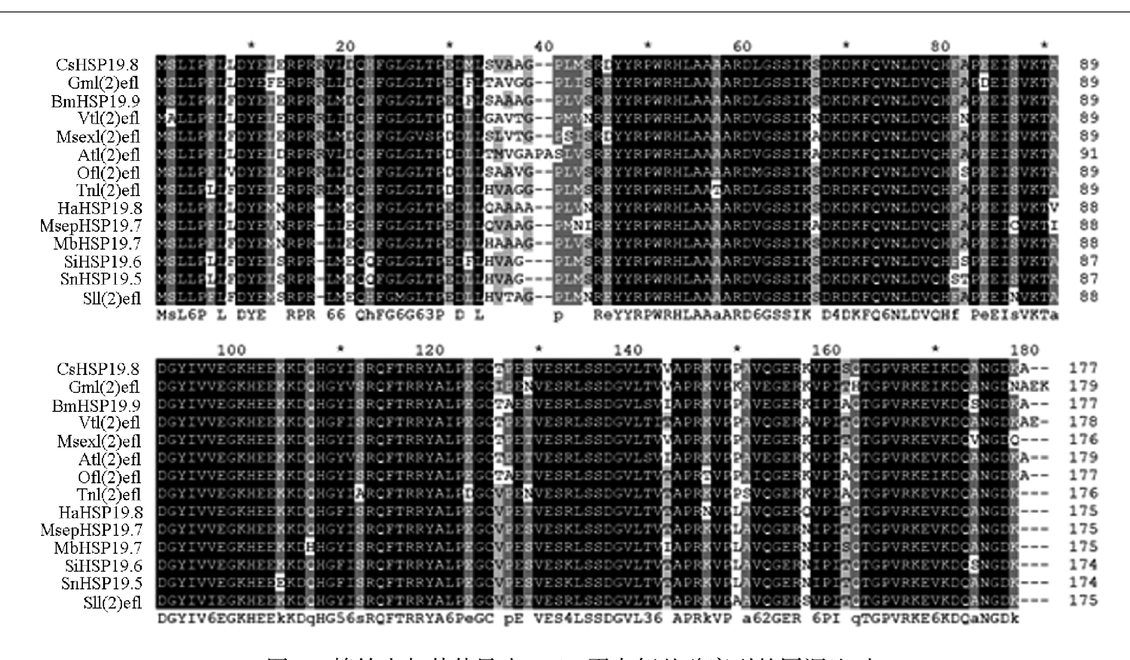


图 2 棉铃虫与其他昆虫 sHSP 蛋白氨基酸序列的同源比对

Fig. 2 Multiple sequence alignment of sHSP proteins from *Helicoverpa armigera* with the homologs from other insects

蛋白来源物种及 GenBank 登录号 Origin species of proteins and their GenBank accession numbers：MsepHSP19.7：粘虫 *Mythimna separata*（ATN45243.1）；BmHSP19.9：家蚕 *Bombyx mori*（NP_001036984.1）；Msexl(2)efl：烟草天蛾 *Manduca sexta*（XP_030040783.1）；HaHSP19.8：棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（XP_021195228.1）；MbHSP19.7：甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae*（BAF03558.1）；Sll(2)efl：斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*（XP_022837108.1）；SiHSP19.6：大螟 *Sesamia inferens*（AJA32867.1）；SnHSP19.5：玉米蛀茎夜蛾 *Sesamia nonagrioides*（ACD01216.1）；Atl(2)efl：脐橙螟 *Amyelois transitella*（XP_013193350.1）；Vtl(2)efl：夏威夷红蛱蝶 *Vanessa tameamea*（XP_026486064.1）；Ofl(2)efl：亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis*（XP_028168138.1）；Tnl(2)efl：粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni*（XP_026733853.1）；Gml(2)efl：大蜡螟 *Galleria mellonella*（XP_026760351.1）；CsHSP19.8：二化螟 *Chilo suppressalis*（AGC23337.1）. 图 3 同 The same for Fig. 3.

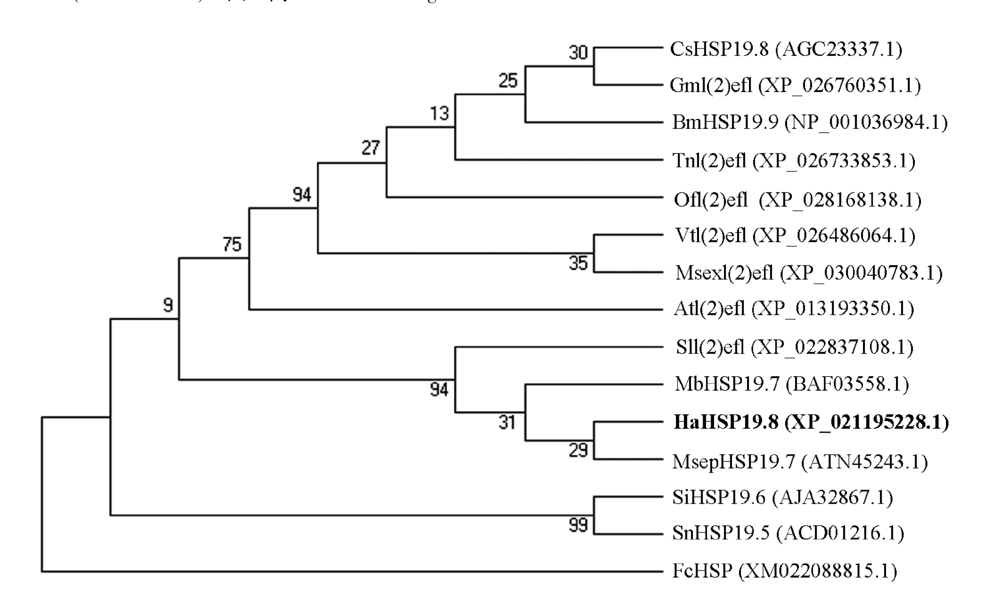


图 3 最大相似法构建的基于氨基酸序列的昆虫 sHSP 蛋白系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of sHSP proteins in insects constructed by maximum likelihood method based on amino acid sequence

Fc：白符跳 *Folsomia candida*. 利用 MEGA 7 的最大相似法构建系统进化树；利用 bootstrap 对进化树分支置信度检测进行 1 000 次计算，分支上的数值表示置信度。Phylogenetic tree was generated by maximum likelihood method with MEGA 7 software, and the topology was tested by 1 000 replicates using bootstrap analysis. Values on the branches indicate the confidence level.

调 113.37 倍（$F=41.35$, $P=0.0001$），2 h 时该基因表达降低。该 *HaHSP19.8* 基因同样响应 Cry1Ac 杀虫蛋白的诱导，在棉铃虫取食含 30 μg/mL Cry1Ac 全长杀虫蛋白的人工饲料后 1 h 和 2 h 均表现为显著的表达上调（$F=79.34$, $P=0.0001$），分别上调 20.67 和 30.50 倍（图 4：B）。

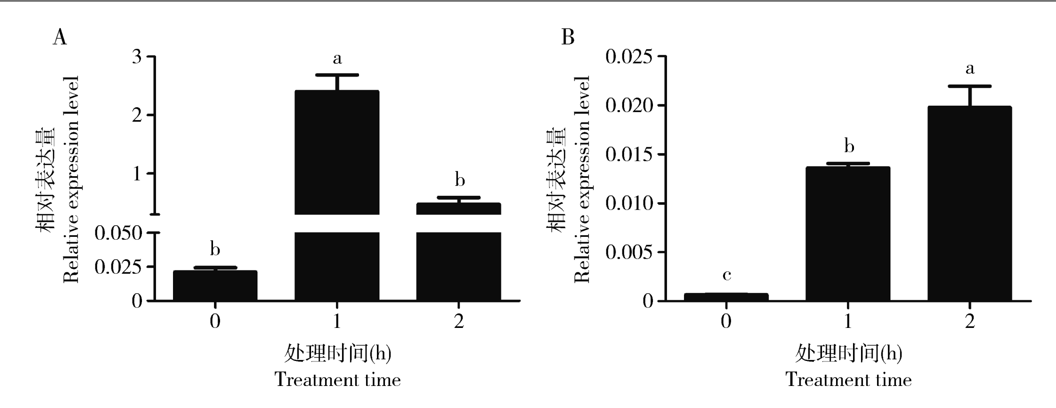


图 4　40℃高温(A)和饲喂含 30 μg/mL Cry1Ac 的人工饲料(B)时棉铃虫 Cry1Ac 敏感品系 5 龄幼虫中 *HaHSP19.8* 基因的相对表达量

Fig. 4　Relative expression levels of *HaHSP19.8* in the 5th instar larvae of the Cry1Ac-susceptible *Helicoverpa armigera* after exposed to high temperature of 40℃ (A) and fed with the artificial diet containing 30 μg/mL Cry1Ac (B)

图中数据为平均值 ± 标准误；柱上小写字母表明棉铃虫在处理后各时间点 *HaHSP19.8* 基因的表达量的显著性差异($P<0.05$, Tukey 氏 HSD 检验)。Data in the figure are mean ± *SE*. Different small letters above bars indicate significant difference in the expression level of *HaHSP19.8* gene at different time points after treatment ($P<0.05$, Tukey's HSD test).

2.3　*HaHSP19.8* 在 Cry1Ac 抗感棉铃虫不同发育阶段的表达差异

通过比较 Cry1Ac 敏感的 LF 和 Cry1Ac 抗性的 LF120 两种品系的 *HaHSP19.8* 基因,并没有发现碱基或者氨基酸的差异。利用 qRT-PCR 分析 *HaHSP19.8* 基因在不同发育阶段的表达谱,结果表明 *HaHSP19.8* 基因在 Cry1Ac 敏感的 LF 品系各个发育阶段均普遍表达,其中成虫和 5 龄幼虫期表达量最高,蛹期表达最低(图 5)。但是在 Cry1Ac 抗性 LF120 品系中,各个发育阶段中均未检测到 *HaHSP19.8* 基因的表达。该基因在 Cry1Ac 敏感的 LF 品系各个发育阶段中的表达均显著地高于其在抗性 LF120 品系中的表达($P<0.05$)(图 5)。

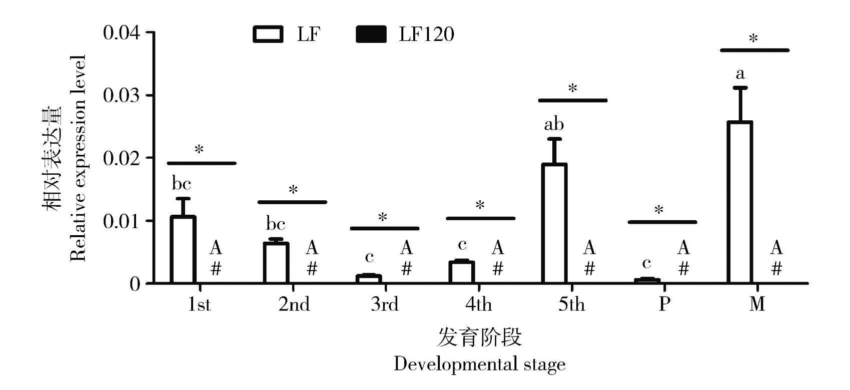


图 5　*HaHSP19.8* 基因在 Cry1Ac 敏感品系 LF 和抗性品系 LF120 品系棉铃虫各发育阶段的相对表达量

Fig. 5　Relative expression levels of *HaHSP19.8* gene in different developmental stages of the Cry1Ac-susceptible strain LF and resistant strain LF120 of *Helicoverpa armigera*

1st: 1 龄幼虫 1st instar larva; 2nd: 2 龄幼虫 2nd instar larva; 3rd: 3 龄幼虫 3rd instar larva; 4th: 4 龄幼虫 4th instar larva; 5th: 5 龄幼虫 5th instar larva; P: 蛹 Pupa; M: 成虫 Adult. #: 未检测到 Not detected. 图中数据为平均值 ± 标准误;柱上小写字母和大写字母分别表示基因表达量在 LF 品系和 LF120 品系棉铃虫各发育阶段间存在显著性差异($P<0.05$, Tukey 氏 HSD 检验);星号表示 LF 和 LF120 中该基因的表达量存在显著性差异($P<0.05$, t 检验)。Data in the figure are mean ± *SE*. Different small letters and capital letters above bars indicate significant difference in the gene expression level in strains LF and LF120, respectively, among different developmental stages ($P<0.05$, Tukey's HSD test). Asterisk indicates significant differences in the gene expression level between strains LF and LF120 ($P<0.05$, t-test).

2.4　*HaHSP19.8* 在 Cry1Ac 抗感棉铃虫 5 龄幼虫不同组织中的表达差异

qRT-PCR 分析 *HaHSP19.8* 基因在 LF 敏感棉铃虫 5 龄幼虫各组织中的表达,结果发现该基因在前肠、中肠、后肠、马氏管和表皮中均有表达,其中在表皮中表达量最高,其次是马氏管、中肠和后肠,前肠中表达量最少(图 6)。但是 *HaHSP19.8* 基因在 LF120 抗性品系幼虫各组织中表现出不一样的表达

模式,具体表现为马氏管中最高,其次是前肠和中肠,在后肠和表皮中未检测到该基因的表达(图 6)。在 Cry1Ac 敏感品系幼虫的中肠、后肠和表皮中,*HaHSP19.8* 基因的表达量均显著高于其在抗性品系 LF120 中的表达量($P<0.05$)(图 6)。

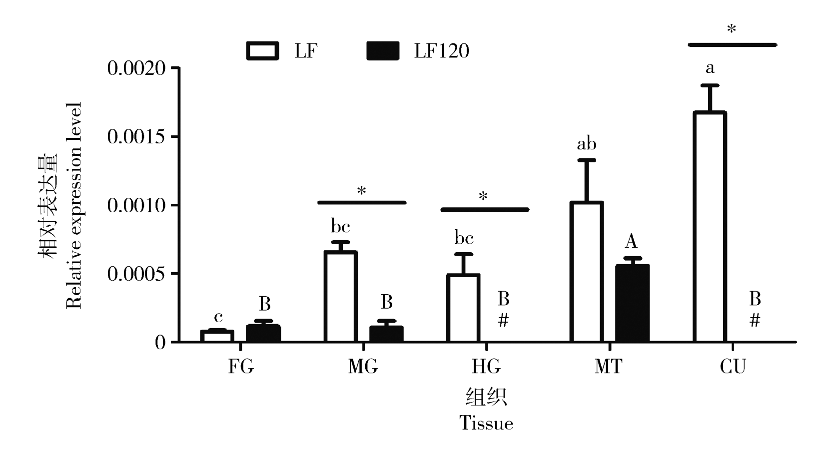


图 6 *HaHSP19.8* 基因在 Cry1Ac 敏感品系 LF 和抗性品系 LF120 棉铃虫 5 龄幼虫各组织中的相对表达量

Fig. 6 Relative expression levels of *HaHSP19.8* gene in different tissues of the 5th instar larvae of the Cry1Ac-susceptible strain LF and resistant strain LF120 of *Helicoverpa armigera*

FG: 前肠 Forehut; MG: 中肠 Midgut; HG: 后肠 Hindgut; MT: 马氏管 Malpighian tubules; CU: 表皮 Cuticle. #: 未检测到 Not detected. 图中数据为平均值 ± 标准误;柱上小写字母和大写字母分别表示在 LF 和 LF120 品系棉铃虫各组织中该基因的表达量存在显著性差异($P<0.05$, Tukey 氏 HSD 检验);星号表示 LF 和 LF120 中该基因的表达量存在显著性差异($P<0.05$, t 检验)。Data in the figure are mean ± *SE*. Different small letters and capital letters above bars indicate significant difference in the gene expression level in strains LF and LF120, respectively, among different tissues ($P<0.05$, Tukey's HSD test). Asterisk indicates significant differences in the gene expression level between strains LF and LF ($P<0.05$, t-test).

3 讨论

经分子生物学技术和生物信息学分析,HaHSP19.8 是典型的小分子热激蛋白(图 1 ~ 3)。昆虫在整个生长阶段必须采取相应的对策来对抗外界压力,其中通过调节热激蛋白的表达就是一种重要的手段(Hoffmann *et al*., 2003; Sørensen *et al*., 2003)。近些年来的研究也表明,HSP 的表达在昆虫抵御高温和杀虫剂胁迫中发挥着重要作用(Kriehuber *et al*., 2010; Basha *et al*., 2013)。例如,42℃可以显著地诱导小菜蛾 12 种 *sHSP* 基因的表达(Chen and Zhang, 2015);斜纹夜蛾的 *HSP19.7* 和 *HSP20.7* 基因响应 40℃的诱导(Shen *et al*., 2011);水稻二化螟幼虫体内 *HSP19.8* 和 *HSP21.7* 基因受高温(39 和 42℃)的诱导超表达(Lu *et al*., 2014)。同时杀虫剂的使用,作为一种外界的非生物因子,也增加了昆虫适应外界环境的压力。在杀虫剂的影响下,褐飞虱 *HSP70*,果蝇 *HSP26* 和 *HSP60* 基因以及云杉夜蛾 *HSP90* 的表达量显著上调(Meunier *et al*., 2006; Doganlar and Doganlar, 2015; Lu *et al*., 2017)。本研究中,*HaHSP19.8* 在 40℃ 高温和 Cry1Ac 杀虫蛋白的诱导下,其表达量在棉铃虫幼虫中都显著地被诱导(图 4)。这些报道和我们的研究结果一起证实:这些热激蛋白的产生和高表达可能与昆虫应对这些不利的生存环境具有重大的联系(Silbermann and Tatar, 2000)。

既然 *sHSP19.8* 在昆虫抗逆过程中过量表达,那么研究其在昆虫各发育阶段和组织的中表达模式,对揭示该基因功能具有重要意义。HaHSP19.8 具有小分子热激蛋白的典型特征,同其他热激蛋白(Kriehuber *et al*., 2010; Basha *et al*., 2012)一样,40℃诱导 1 ~ 2 h 后高表达(图 4)。通过 qRT-PCR 检测,证实 *HaHSP19.8* 在敏感棉铃虫各生长发育阶段和组织中均有表达(图 5 和 6),这表明 HaHSP19.8 可能像其他昆虫的小分子热激蛋白一样广泛地参与到昆虫各个发育阶段的生理生化活动中(Huang *et al*., 2009; Takahashi *et al*., 2010; Shen *et al*., 2011; Concha *et al*., 2012; Lu *et al*., 2014)。但是不同的小分子热激蛋白在昆虫中的表达模式差异很大。与其分子量接近的其他昆虫的小分子热激蛋白的表达有些集中的幼虫期,有些集中在蛹期(Huang *et al*.,

2009；Kokolakis *et al.*, 2009）。*HaHSP19.8* 在成虫中表达量最高（图 5），二化螟 *C. suppressalis* HSP19.8 和斜纹夜蛾 *S. litura* HSP19.7 与棉铃虫的同源性较高（图 2），其在成虫期也表达最高（Shen *et al.*, 2011；Lu *et al.*, 2014），这说明该小分子热激蛋白可能也参与成虫期的生命活动。小分子热激蛋白在昆虫各组织中的特异性表达往往可能与其特殊的功能有关，*HaHSP19.8* 在敏感棉铃虫的表皮、马氏管和中肠内高表达，表明它可能与维持正常的器官功能和在外界压力下保护蛋白质的正常功能有关（Gu *et al.*, 2012）。

HaHSP19.8 响应 Cry1Ac 杀虫蛋白的诱导，表现出过量表达，分析其在抗 Cry1Ac 的棉铃虫品系中的表达模式，qRT-PCR 结果未检测到 *HaHSP19.8* 在抗 Cry1Ac 棉铃虫的各个发育阶段的表达（图 5），在其 5 龄幼虫各组织中也表现出未表达或降低表达（图 6），这可能与抗性棉龄虫表现出来一系列适合度代价有一定的联系。这些适合度代价体现在：抗性昆虫卵的孵化率降低，幼虫的存活率降低、发育历期延长、蛹重减小、繁殖能力下降、交配能力降低，以及抵御非生物学压力的能力降低等（范贤林等，2000；Liang *et al.*, 2007, 2008；邹朗云等，2012）。在抗性棉铃虫中的表达模式再次证实 *HaHSP19.8* 可能在棉铃虫的发育过程中起到很重要的作用。由于目前对小分子热激蛋白在昆虫各组织中的功能研究尚不明确，确切地了解 *HaHSP19.8* 的功能，还需开展更多的功能研究工作。

进一步的比较抗、感 Cry1Ac 棉铃虫中 *HaHSP19.8* 的表达，结果表明 *HaHSP19.8* 在抗性品系中表达量降低，我们推测该小分子热激蛋白可能参与到棉铃虫对 Bt 的抗性机理中，具体的作用方式有下列几种可能：首先，热激蛋白可能作为棉铃虫体内功能蛋白质的分子伴侣，随着功能蛋白质降低表达量参与抵抗 Cry1Ac 的过程而下调表达。在昆虫对 Bt 的抗性机制中，参与 Bt 的消化、降解和结合的蛋白表达量的减少，通常是其重要的作用机制之一（Wei *et al.*, 2018），热激蛋白可能作为它们的重要分子伴侣，参与到蛋白质的正常功能中，当昆虫因这些参与 Bt 作用过程的蛋白的表达量降低时，*HaHSP19.8* 的表达量也显著降低。其次，如其他热激蛋白或者 Bt 的结合蛋白一样（Meunier *et al.*, 2006；Xia *et al.*, 2016），HaHSP19.8 蛋白可能与 Bt 结合发挥毒理，昆虫通过降低该结合蛋白的表达量来抵御 Bt 毒素。第三，HaHSP19.8 可能如小菜蛾 Hsp90 一样，可以与 Bt 蛋白结合，保持 Bt 蛋白的正确折叠，以提高 Bt 的毒性（García-Gómez *et al.*, 2019），而作为昆虫的抗性机制，*HaHSP19.8* 的表达量下调来降低 Bt 的毒性。第四，*HaHSP19.8* 可能仅仅作为生长发育中的重要作用因子，因昆虫对 Bt 的适合度代价或免疫性活动在抗性个体中降低表达。在小菜蛾 Bt 抗性研究中表明，表达量降低的 HSP70 作为上游的免疫调控因子，可能激活了 JNK，ERK 和 p38 激酶等而使小菜蛾对 Bt 产生抗性（Xia *et al.*, 2016）。本研究初步证实了 *HaHSP19.8* 在棉铃虫的生长发育中起到重要作用，该基因可能参与到棉铃虫对 Cry1Ac 的抗性机理中。但对于其具体的作用方式还有待下一步深入研究。

参考文献（References）

An JJ, Gao Y, Lei C, Gould F, Wu KM, 2014. Monitoring cotton bollworm resistance to Cry1Ac in two counties of northern China during 2009 – 2013. *Pest Manag. Sci.*, 71(3): 377 – 382.

Basha E, Jones C, Blackwell AE, Cheng G, Waters ER, Samsel KA, Siddique M, Pett V, Wysocki V, Vierling E, 2013. An unusual dimeric small heat shock protein provides insight into the mechanism of this class of chaperones. *J. Mol. Biol.*, 425(10): 1683 – 1696.

Bepperling A, Alte F, Kriehuber T, Braun N, Weinkauf S, Groll M, 2012. Alternative bacterial two-component small heat shock protein systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(50): 20407 – 20412.

Cancino-Rodezno A, Lozano L, Oppert C, Castro JI, Lanz-Mendoza H, Encarnación S, Evans AE, Gill SS, Soberón M, Jurat-Fuentes JL, Bravo A, 2012. Comparative proteomic analysis of *Aedes aegypti* larval midgut after intoxication with Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis*. *PLoS ONE*, 7(5): e37034.

Cao GC, Feng HQ, Guo F, Wu KM, Li XC, Liang GM, Desneux N, 2014. Quantitative analysis of fitness costs associated with the development of resistance to the Bt toxin *Cry1Ac* in *Helicoverpa armigera*. *Sci. Rep.*, 4: 5629.

Chen L, Liang G, Zhang J, Wu KM, Guo Y, Rector B, 2010. Proteomic analysis of novel Cry1Ac binding proteins in *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 73(2): 61 – 73.

Chen XE, Zhang YL, 2015. Identification of multiple small heat-shock protein genes in *Plutella xylostella* (L.) and their expression profiles in response to abiotic stresses. *Cell Stress Chaperones*, 20(1): 23 – 35.

Concha C, Edman RM, Belikoff EJ, Schiemann AH, Carey B, Scott MJ, 2012. Organization and expression of the Australian sheep blowfly (*Lucilia cuprina*) *hsp*23, *hsp*24, *hsp*70 and *hsp*83 genes. *Insect Mol. Biol.*, 21(2): 169 – 180.

Doganlar O, Doganlar ZB, 2015. Responses of antioxidant enzymes and heat shock proteins in *Drosophila* to treatment with a pesticide mixture. *Arch. Biol. Sci.*, 67(3): 869 – 876.

Fan XL, Meng XQ, Rui CH, 2000. Relative fitness of cotton bollworm population against Bt insecticidal protein. *Chin. J. Pestic. Sci.*, 2(3): 35–38. [范贤林, 孟香清, 芮昌辉, 2000. 抗 Bt 杀虫蛋白棉铃虫种群的相对适合度. 农药学学报, 2(3): 35–38]

Feder ME, Hofmann GE, 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.*, 61: 243–282.

García-Gómez BI, Cano SN, Zagal EE, Dantán-Gonzalez E, Bravo A, Soberón M, 2019. Insect Hsp90 chaperone assists *Bacillus thuringiensis* Cry toxicity by enhancing protoxin binding to the receptor and by protecting protoxin from gut protease degradation. *mBio*, 10(6): e02775.

Gu J, Huang LX, Shen Y, Huang LH, Feng QL, 2012. Hsp70 and small Hsps are the major heat shock protein members involved in midgut metamorphosis in the common cutworm. *Spodoptera litura*. *Insect Mol. Biol.*, 21(5): 535–543.

Hartl FU, Hayer-Hartl M, 2002. Molecular chaperones in the cytosol: fromnascent chain to folded protein. *Science*, 295(5561): 1852–1858.

Hoffmann AA, Sorensen JG, Loeschcke V, 2003. Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches. *J. Therm. Biol.*, 28(3): 175–216.

Huang LH, Kang L, 2007. Cloning and interspecific altered expression of heat shock protein genes in two leaf miner species in response to thermal stress. *Insect Mol. Biol.*, 16(4): 491–500.

Huang LH, Wang CZ, Kang L, 2009. Cloning and expression of five heat shock protein genes in relation to cold hardening and development in the leafminer, *Liriomyza sativa*. *J. Insect Physiol.*, 55(3): 279–285.

Jin L, Zhang HN, Lu YH, Yang YH, Wu KM, Tabashnik BE, Wu YD, 2015. Large-scale test of the natural refuge strategy for delaying insect resistance to transgenic Bt crops. *Nat. Biotech.*, 33(2): 169–174.

Kokolakis G, Kritsidima M, Tkachenko T, Mintzas AC, 2009. Two *hsp*23 genes in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*: structural characterization, heat shock regulation and developmental expression. *Insect Mol. Biol.*, 18(2): 171–181.

Kriehuber T, Rattei T, Weinmaier T, Bepperling A, Haslbeck M, Buchner J, 2010. Independent evolution of the core domain and its flanking sequences in small heat shock proteins. *FASEB J.*, 24(10): 3633–3642.

Kurzik-Dumke U, Lohmann E, 1995. Sequence of the new *Drosophila melanogaster* small heat-shock-related gene, lethal(2) essential for life [l(2)efl], at locus 59F4,5. *Gene*, 154(2): 171–175.

Liang GM, Tan WJ, Guo YY, 1999. An improvement in the technique of artificial rearing cotton bollworm. *Plant Prot.*, 25(2): 15–17. [梁革梅, 谭维嘉, 郭予元, 1999. 人工饲养棉铃虫技术的改进. 植物保护, 25(2): 15–17]

Liang GM, Wu KM, Rector B, Guo YY, 2007. Diapause, cold hardiness and flight ability of Cry1Ac-resistant and -susceptible strains of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Eur. J. Entomol.*, 104(4): 699–704.

Liang GM, Wu KM, Yu HK, Li KK, Feng X, Guo YY, 2008. Changes of inheritance mode and fitness in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) along with its resistance evolution to cry1ac toxin. *J. Invertebr. Pathol.*, 97(2): 142–149.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.

Lu K, Chen X, Liu WT, Zhang ZC, Wang Y, You KK, Li Y, Zhang RB, Zhou Q, 2017. Characterization of heat shock protein 70 transcript from *Nilaparvata lugens* (Stål): its response to temperature and insecticide stresses. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 142: 102–110.

Lu MX, Hua J, Cui YD, Du YZ, 2014. Five small heat shock protein genes from *Chilo suppressalis*: characteristics of gene, genomic organization, structural analysis, and transcription profiles. *Cell Stress Chaperones*, 19(1): 91–104.

Lu YH, Jiang YY, Liu J, Zeng J, Yang XM, Wu KM, 2018. Adjustment of cropping structure increases the risk of cotton bollworm outbreaks in China. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 55(1): 19–24. [陆宴辉, 姜玉英, 刘杰, 曾娟, 杨现明, 吴孔明, 2018. 种植业结构调整增加棉铃虫的灾变风险. 应用昆虫学报, 55(1): 19–24]

Meunier L, Préfontaine G, van Munster M, Brousseau R, Masson L, 2006. Transcriptional response of *Choristoneura fumiferana* to sublethal exposure of Cry1Ab protoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Mol. Biol.*, 15(4): 475–483.

Nakasu EY, Firmino AAP, Dias SC, Rocha TL, Ramos HB, Oliveira GR, Lucena W, Carlini CR, Grossi-de-Sá MF, 2010. Analysis of Cry8Ka5-binding proteins from *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) midgut. *J. Invertebr. Pathol.*, 104(3): 227–230.

Nollen EA, Morimoto RI, 2002. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *J. Cell Sci.*, 115(14): 2809–2816.

Shen Y, Gu J, Huang LH, Zheng SC, Liu L, Xu WH, Feng QL, Kang L, 2011. Cloning and expression analysis of six small heat shock protein genes in the common cutworm. *Spodoptera litura*. *J. Insect Physiol.*, 57(7): 908–914.

Silbermann R, Tatar M, 2000. Reproductive costs of heat shock protein in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 54(6): 2038–2045.

Sørensen JG, Kristensen TN, Loeschcke V, 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol. Lett.*, 6(11): 1025–1037.

Takahashi KH, Rako L, Takano-Shimizu T, Hoffmann AA, Lee SF, 2010. Effects of small *Hsp* genes on developmental stability and micro environmental canalization. *BMC Evol. Biol.*, 10: 284.

Wei JZ, Liang GM, Wang BJ, Zhong F, Chen L, Khaing MM, Zhang J, Guo YY, Wu KM, Tabashnik BE, 2016. Activation of Bt protoxin Cry1Ac in resistant and susceptible cotton bollworm. *PLoS ONE*, 11(6): e0156560.

Wei JZ, Yang S, Chen L, Liu XG, Du MF, An SH, Liang GM, 2018. Transcriptomic responses to different Cry1Ac selection stresses in

Helicoverpa armigera. *Front*. *Physiol*., 9：1653.

Welch KL, Unnithan GC, Degain BA, Wei JZ, Zhang J, Li XC, 2015. Cross-resistance to toxins used in pyramided Bt crops and resistance to Bt sprays in *Helicoverpa zea*. *J*. *Invertebr*. *Pathol*., 132：149 – 156.

Wu KM, 2007. Monitoring and management strategy for *Helicoverpa armigera* resistance to Bt cotton in China. *J*. *Invertebr*. *Pathol*., 95 (3)：220.

Wu KM, Guo YY, 2005. The evolution of cotton pest management practices in China. *Annu*. *Rev*. *Entomol*., 50：31 – 52.

Xia JX, Guo ZJ, Yang ZZ, Zhu X, Kang S, Yang X, Yang FS, Wu QG, Wang SL, Xie W, Xu WJ, Zhang YJ, 2016. Proteomics-based identification of midgut proteins correlated with Cry1Ac resistance in *Plutella xylostella*. *Pestic*. *Biochem*. *Physiol*., 132：108 – 117.

Xu L, Ferry N, Wang ZY, Zhang J, Edwards MG, Gatehouse AMR, He KL, 2013. A proteomic approach to study the mechanism of tolerance to Bt toxins in *Ostrinia furnacalis* larvae selected for resistance to Cry1Ab. *Transgenic Res*., 22：1155 – 1166.

Yang XQ, Zhang YL, Wang XQ, Dong H, Gao P, Jia LY, 2016. Characterization of multiple heat shock protein transcripts from *Cydia pomonella*：their response to extreme temperature and insecticide exposure. *J*. *Agric*. *Food Chem*., 64(21)：4288 – 4298.

Yuan C, Ding XZ, Xia LQ, Yin J, Huang SY, Huang F, 2011. Proteomic analysis of BBMV in *Helicoverpa armigera* midgut with and without Cry1Ac toxin treatment. *Biocontrol Sci*. *Technol*., 21(2)：139 – 151.

Zhang HN, Wu SW, Yang YH, Tabashnik BE, Wang YD, 2012. Non-recessive Bt toxin resistance conferred by an intracellular cadherin mutation in field-selected populations of cotton bollworm. *PLoS ONE*, 7(12)：e53418.

Zou LY, Li YM, Zhang Y, Wei JZ, Liang GM, Guo YY, 2012. Stability of cotton bollworm on Cry1Ac resistance and its effect on fitness. *J*. *Plant Prot*., 39(1)：70 – 74.［邹朗云, 李艳梅, 张彦, 魏纪珍, 梁革梅, 郭予元, 2012. 棉铃虫对 Cry1Ac 抗性的稳定性及其对适合度的影响. 植物保护学报, 39(1)：70 – 74］

（责任编辑：马丽萍）